

一步法快速 WB (HRP) 试剂盒 (兔)

项目号: 0665490

储存条件: 2-8℃。

产品内容

Component	0665490	0665490
	10preps	50preps
BlockingBuffer	100ml	500ml
AntibodyPretreatSolution (HRP/Rabbit)	1ml	5×1ml
DilutionBuffer	100ml	500ml
WashBuffer (10×)	100ml	500ml

产品简介

一步法快速 WB 试剂盒 (兔) 是康为世纪最新研发的 WesternBlot 检测试剂盒, 能够在 1 小时左右得到高质量的 WesternBlot 结果, 且操作简便、检测灵敏度高、背景低、不需再加入二抗、系统稳定性强。常规的 WesternBlot 间接法检测过程 (封闭、一抗结合和二抗结合) 需要较长的时间, 实验流程复杂且需要多步条件优化。胶上的蛋白转移到载体膜上后, 使用试剂盒中的封闭液孵育 5min, 再用抗体反应液处理后的一抗孵育载体膜, 经洗涤三次 (每次 5min) 后, 即可进行发光或显色检测。本试剂盒针对目的蛋白一抗为兔来源的实验系统使用。

注意事项

1. 客户需自己准备兔来源的一抗。
2. 使用 BlockingBuffer 封闭液、AntibodyPretreatSolution (HRP/Rabbit) 抗体反应液 (兔)、WashBuffer (10×) 漂洗液之前请充分混匀。
3. 漂洗液如在 2-8℃ 保存时出现沉淀, 请恢复到室温, 把沉淀溶解后正常使用, 1×漂洗液可在室温保存一个月。
4. 建议转膜完成后用丽春红等试剂染色, 并把膜上多余部分剪去以增加试剂的使用效率。
5. 一抗和抗体反应液 HRP (兔) 需要通过预实验来确定最佳的稀释用量。
6. 抗体反应液 HRP (兔)、抗体稀释液和抗体用量可根据膜的大小按比例放大或减少。
7. 加入一抗的抗体稀释液可以回收重复使用一次。特异性及亲和力低的抗体不建议重复使用。回收后抗体如在 1-2 天内使用放置在 2-8℃, 长期保存请在 -20℃ 冻存, 避免多次反复冻融。
8. 如果存在较高背景的情况, 请调整抗体的用量, 并增加洗膜次数。9. 试剂盒内所有试剂请于 2-8℃ 保存, 避免冻融。

操作步骤

本产品适用于转膜完成后的封闭及抗体孵育步骤, 以 5cm×8cm 膜为例:

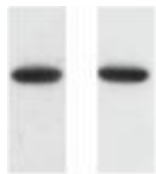
1. 漂洗液准备: 取 10ml WashBuffer (10×) 用蒸馏水稀释至 100ml, 即为 1×WashBuffer, 待用。每次洗膜用 8-10ml。
2. 封闭: 转膜完成后, 将膜浸没到 10ml BlockingBuffer 中, 室温封闭 5 分钟。
3. 漂洗: 倒掉封闭液, 加入 8-10ml 1×WashBuffer, 于摇床上用较大速度漂洗 1 分钟。
4. 洗膜的同时可准备抗体孵育液: 取 AntibodyPretreatSolution (HRP/Rabbit) 100 μl 到离心管中, 加入兔

源一抗 3-10 μ g, 枪头吸打至充分混匀, 室温孵育 5 分钟。加入至 10ml Dilution Buffer 中, 充分混匀。

注意:

- 1) 一抗的用量也可根据抗体的稀释度来调整。以抗体的最终稀释度 1:1000 为例, 取 100 μ l 抗体反应液 HRP (兔) 到 EP 管中, 加入 10 μ l 一抗, 加入到 10ml 抗体稀释液中, 充分混匀, 室温孵育 5 分钟。
- 2) 如果膜面积较小, 可按比例减少抗体、反应液及稀释液的用量。
5. 完成步骤 3 后, 倒掉漂洗液, 将一抗、Antibody Pretreat Solution (HRP/Rabbit) 及 Dilution Buffer 混合而成的抗体孵育液加到膜上 (确保孵育液完全浸没膜表面), 在摇床上以 60rpm 左右的速度室温孵育 40 分钟。
6. 弃去 (回收) 抗体孵育液, 用配制的 1 $\times$ Wash Buffer 漂洗 3-5 次, 每次 3 分钟。
7. 进行后续检测。建议采用 ECL 或者 DAB 法进行检测。

应用实例



实例一抗原为 293T 细胞全裂解液

A: 普通 WB 对照: beta-actin 兔多抗 3.3 μ g 室温孵育 40min, 洗膜后二抗羊抗兔-HRP1: 10000 稀释, 室温 40min, ECL 曝光



实例二抗原为 293T 细胞全裂解液

C: 普通 WB 对照: PAK1, Epitomics 兔单抗 1: 1000 室温孵育 40min, 洗膜后二抗羊抗兔-HRP1: 10000 稀释, 室温 40min, ECL 曝光

D: 一步法 WB: Epitomics 兔单抗 1: 1000 室温孵育 40min, ECL 曝光。

附表

常见问题及解决办法

问题	可能原因	解决方案
信号太弱 或者看不到条带	蛋白上样量太少	进行 SDS-PAGE 电泳时加大上样量。
	蛋白转膜效率太低	优化转膜时间或者电流, 确保转膜时膜与胶之间没有气泡。
	一抗亲和力较低	增加膜在溶液中的孵育时间或者增加抗体浓度可以增加信号
	一抗亲和力较低	对于低亲和力抗体来说, 减少洗膜时间可以增加信号。由每次 10min, 减少到每次 5min 可以增加信号。
背景偏高	一抗使用过量	减少一抗的使用量。
	一抗有非特异性结合或者与封闭试剂有交叉反应	使用和二抗来源一致的血清或者无 IgG 的 BSA
	洗膜时间太短	增加洗涤的步骤可以进一步的降低背景。
	曝光显影时间过长	减少曝光时间。如果信号和背景都高, 可以等待一段时间, 等背景信号减弱后, 再进行曝光。
	容器或者试剂被污染	每次洗涤的时候使用清洁的容器。带手套, 使用清洁的镊子处理膜。